

PUB-NO: DE004326473A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: DE 4326473 A1

TITLE: Scanning microscope for viewing at an angle relative to  
the illumination

PUBN-DATE: February 9, 1995

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
STELZER, ERNST H K DR	DE
LINDEK, STEFFEN	DE
PICK, RAINER	DE

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
EUROP MOLECULAR BIOLOGY LAB	DE

APPL-NO: DE04326473

APPL-DATE: August 6, 1993

PRIORITY-DATA: DE04326473A ( August 6, 1993)

INT-CL (IPC): G02B021/00, G02B021/06

EUR-CL (EPC): G02B021/00 ; G02B021/00, G02B021/00 , G02B021/00

US-CL-CURRENT: 359/385

ABSTRACT:

CHG DATE=19990617 STATUS=O> The invention relates to a scanning microscope having at least one light source, at least one photodetector and at least two objectives (lenses) which illuminate, preferably simultaneously, at least one, preferably a joint, object point and/or collect the light emerging therefrom, at least two of the objectives not being located on a common axis. Viewing is carried out at an angle, preferably  $\pi/2$ , relative to the illumination of the sample. The observation volume can be changed anisotropically by suitable inventive optical arrangements. <IMAGE>

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 43 26 473 A 1

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
G 02 B 21/00  
G 02 B 21/06

21 Aktenzeichen: P 43 26 473.5  
22 Anmeldetag: 6. 8. 93  
43 Offenlegungstag: 9. 2. 95

DE 43 26 473 A 1

71 Anmelder:  
European Molecular Biology Laboratory, 69117  
Heidelberg, DE

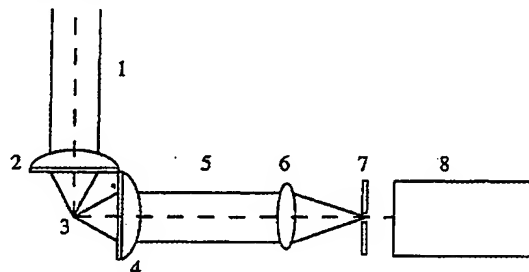
72 Erfinder:  
Stelzer, Ernst H.K., Dr., 69126 Heidelberg, DE;  
Lindek, Steffen, 69115 Heidelberg, DE; Pick, Rainer,  
69126 Heidelberg, DE

56 Entgegenhaltungen:  
DE 40 40 441 A1  
DE 39 06 555 A1  
DE 34 17 075 A1  
US 43 50 892  
JP 05-1 64 970 A2  
JP 01-2 77 812 A2  
JP 1-277812 A. In: Patents Abstracts of Japan, P-997,  
Jan. 29, 1990, Vol. 14, No. 48;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Rastermikroskop zur Beobachtung unter einem Winkel zur Beleuchtung

57 Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop mit mindestens einer Lichtquelle, mindestens einem Lichtdetektor und mindestens zwei Objektiven, die mindestens einen, vorzugsweise gemeinsamen, Objektpunkt, vorzugsweise gleichzeitig, beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln, wobei mindestens zwei der Objektive nicht auf einer gemeinsamen Achse liegen. Die Beobachtung erfolgt in einem Winkel, vorzugsweise  $\pi/2$ , zur Beleuchtung der Probe. Das Beobachtungsvolumen kann durch geeignete erfindungsgemäße optische Anordnungen anisotrop verändert werden.



DE 43 26 473 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen  
BUNDESDRUCKEREI 12. 94 408 066/307

7/29

Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop mit mindestens einer Lichtquelle, mindestens einem Lichtdetektor und mindestens zwei Objektiven, die mindestens einen, vorzugsweise gemeinsamen, Objektpunkt, vorzugsweise gleichzeitig, beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln, wobei mindestens zwei der Objektive nicht auf einer gemeinsamen Achse liegen.

Für die genaue dreidimensionale Erfassung eines Punktojektes oder eines Punktes eines Objekts mit einem Mikroskop ist die Auflösung entlang aller drei Raumachsen zu verbessern. Dieses kann mittels Vergrößerung der Apertur der Objektive oder/und mittels Verkleinerung der Wellenlängen des ein- und/oder ausgehenden Lichts erfolgen. Bisher wurde bei der Entwicklung von Mikroskopen besonderer Wert auf die Vergrößerung der Apertur der Objektive gelegt. Dadurch wird vor allem die Auflösung senkrecht zu der Beleuchtungsachse, die üblicherweise als optische Achse bezeichnet wird, erhöht. Aus der technisch-wissenschaftlichen Literatur sind konfokale Rastermikroskope bekannt, die eine Auflösung entlang der optischen Achse (axiale Auflösung) aufweisen und Bilder mit einer deutlich verbesserten Schärfe erzeugen können. Ein Problem ist, daß Objektive maximal 35% der um die optische Achse zentrierten Fläche erfassen. Das führt dazu, daß die axiale Auflösung bestenfalls dreimal so schlecht wie die axiale Auflösung ist. Im allgemeinen ist das Verhältnis größer.

Für die zusätzliche Erhöhung der Auflösung in axialer Richtung wurde in der DE-OS 40 40 441 ein doppelkonfokales Rastermikroskop vorgeschlagen, das durch die Verwendung eines zweiten Objektivs auf der anderen Seite der Objektebene gekennzeichnet ist, wobei beide Objektive einen gemeinsamen Objektpunkt gleichzeitig beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht detektieren. Wird das Objekt über die beiden Objektive kohärent beleuchtet, so wird das Beobachtungsvolumen durch Interferenz längs der optischen Achse reduziert. Zwei Probleme dieser Methode sind: a) Die Phasendifferenz im gemeinsamen geometrischen Fokus der Objektive ist a priori nicht zu bestimmen, so daß die Lichtverteilung zunächst unbekannt ist. Vorteilhafterweise muß die Phasendifferenz ein ganzzahliges Vielfaches von  $2\pi$  sein, so daß die Interferenz konstruktiv ist. b) Im vorteilhaften Fall der konstruktiven Interferenz im geometrischen Fokus treten neben dem schmalen Hauptmaximum weitere axiale Nebenmaxima auf, so daß außer dem abzubildenden Punkt im geometrischen Fokus noch andere Punkte erheblich zu dem Signal des doppelkonfokalen Rastermikroskops beitragen. Aus diesen Gründen führt das doppelkonfokale Rastermikroskop zunächst nicht zu Bildern mit einer höheren Auflösung.

Diese bekannten Rastermikroskope definieren eine Objektebene und unterscheiden dadurch von dem erfindungsgemäßen Rastermikroskop. Sie sind nicht dazu geeignet, Licht, das senkrecht zur Beleuchtungsrichtung von dem abzubildenden Objektpunkt ausgeht, zu detektieren. Des weiteren unterscheiden sie sich durch die Definition einer optischen Achse und besitzen (im Fall des doppelkonfokalen Rastermikroskops) vorzugsweise zwei Objektive, die gegeneinander gerichtet und zu dieser optischen Achse und zueinander zentriert sind.

Das doppelkonfokale Rastermikroskop dient im Gegensatz zu dem erfindungsgemäßen Rastermikroskop zur Verbesserung der Auflösung allein mittels Interfe-

renz. Die tatsächliche Verbesserung der Auflösung hängt dabei von der Lösung der beiden oben genannten Probleme ab.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, ein Rastermikroskop vorzuschlagen, dessen Auflösung entlang aller drei Raumachsen in etwa gleich ist und das Beobachtungsvolumen kleiner als in den bekannten Rastermikroskopen ist. Die Aufgabe ist es, das Ziel auch zu erreichen, ohne daß die Phasendifferenz des Beleuchtungs- und des Detektionslichts bekannt sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß bei einem Rastermikroskop der eingangs genannten Art mindestens zwei Objektive derart angeordnet sind, daß sie mindestens einen Objektpunkt gleichzeitig beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln, wobei mindestens zwei der Objektive nicht auf einer gemeinsamen Achse liegen.

Zusätzlich können wie bei einem doppelkonfokalen Rasterlichtmikroskop Interferenzveränderungsmittel derart angeordnet sein, daß Licht, das ganz oder teilweise durch eines der Objektive hindurchgegangen ist, mit Licht, das ganz oder teilweise durch eines der anderen Objektive hindurchgegangen ist, am Objekt und/oder an mindestens einem der Lichtdetektoren kohärent oder teilweise kohärent überlagert wird, so daß es interferiert und eine gezielte Beeinflussung der Interferenzmuster durch Interferenzveränderungsmittel möglich ist.

Vorzugsweise sind zwei Objektive so angeordnet, daß sie auf denselben Objektpunkt fokussiert sind und ihre Achsen senkrecht aufeinander stehen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind drei Objektive so angeordnet, daß sie auf denselben Objektpunkt fokussiert sind und die Achsen zweier Objektive senkrecht aufeinander stehen, während die Achse des dritten Objektivs auf der Achse eines der beiden anderen Objektive liegt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind drei Objektive so angeordnet, daß ihre Achsen paarweise senkrecht aufeinander stehen.

Gemäß weiterer bevorzugter Ausführungsformen sind vier, fünf oder sechs Objektive so auf einer Kugelfläche um den gemeinsamen geometrischen Fokus und/oder den abzubildenden Punkt angeordnet, daß ihre Achsen beliebige Winkel zueinander einnehmen.

Gemäß weiterer besonders bevorzugter Ausführungsformen sind vier, fünf oder sechs Objektive senkrecht zu den Flächen eines Würfels angeordnet, in dessen Mitte der gemeinsame geometrische Fokus und/oder der abzubildende Objektpunkt liegt.

Vorteilhafterweise haben die Objektive die gleiche numerische Apertur oder auch verschiedene.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform befindet sich in mindestens einer der Ebenen, die zu den Fokalebene der Objektive optisch konjugiert sind, mindestens eine Blende. Eine Blende wird insbesondere dann vorgesehen, wenn sich die optisch zur Fokalebene konjugierte Ebene vor einem Lichtdetektor befindet, der das durch die Blende gegangene Licht registriert, und/oder wenn diese Blende im Beleuchtungsstrahl zur Formung der Lichtquelle dient. Diese Blende ist üblicherweise eine Lochblende.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird Interferenz bei der Überlagerung der Beleuchtungslichtstrahlen und/oder bei der Überlagerung der Detektionslichtstrahlen zur Verbesserung der Auflösung ausgenutzt. Dabei wird Licht, das ganz oder teil-

weise durch eines der Objektive hindurchgegangen ist, mit Licht, das ganz oder teilweise durch eines der anderen Objektive hindurchgegangen ist, am Objekt und/oder an mindestens einem der Lichtdetektoren kohärent oder teilweise kohärent überlagert, so daß es interferiert und eine gezielte Beeinflussung der Interferenzmuster durch Interferenzveränderungsmittel möglich ist. Hierbei können die Objektive, durch die die interferierenden Lichtstrahlen gehen, auf der gleichen Achse liegen oder auf Achsen, die einen Winkel bilden, der kleiner als  $\pi$  ist, liegen. Der Begriff der Objektebene verliert in diesem Aufbau seine übliche Bedeutung.

Vorteilhafterweise verändern die Interferenzveränderungsmittel die Interferenzmuster schnell oder auch langsam. Insbesondere verändert eine Kompensationsvorrichtung die Phasendifferenz zwischen den Lichtstrahlen, die durch eines der Objektive hindurchgehen, und den Lichtstrahlen, die durch ein anderes der Objektive hindurchgehen, schnell oder auch langsam.

Gemäß einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Veränderung der Interferenzmuster periodisch durchgeführt.

Das erfindungsgemäße Rastermikroskop kann ein Fluoreszenzmikroskop sein. Durch geeignete optisch aktive Elemente kann die Interferenz von Strahlen, die durch verschiedene Objektive fallen, bewirkt oder verhindert werden. Das erfindungsgemäße Rastermikroskop kann aber auch ein Mikroskop sein, das mit Streulicht arbeitet. Bei der Beobachtung von Streulicht können geeignete Polarisationsfilter in die Strahlengänge eingeführt werden. Geeignete optische Elemente sind beispielsweise Polarisatoren, spektrale Filter und optisch aktive Elemente, die die Polarisationsrichtung des Lichtes verändern.

Als Lichtquellen sind alle Quellen geeignet, die eine ausreichende Intensität zur Verfügung stellen. Vorteilhafterweise handelt es sich um Punktlichtquellen bzw. Quellen, die sich auf einen Punkt fokussieren lassen. Vorteilhafterweise wird bei Fluoreszenzmikroskopie ein gepulster oder auch nicht-gepulster Laser eingesetzt, der die Zwei- und/oder Mehrphotonenabsorption ermöglicht.

Die Umlenkung der Lichtstrahlen in dem Mikroskop findet über geeignete Umlenkelemente statt. Dies sind beispielsweise Spiegel, dichroitische Spiegel, Strahlteiler oder optische Fasern. Vorteilhafterweise entfällt in der Fluoreszenzmikroskopie bei der Detektion senkrecht zu der Beleuchtungsrichtung die Verwendung von dichroitischen Spiegeln im Detektionslichtpfad.

Als Lichtdetektoren sind Photomultiplier gut geeignet, aber auch Detektoren mit räumlicher Auflösung und auch andere Empfänger, die Lichtsignale in elektrische Signale bzw. in elektrisch auswertbare Signale umwandeln.

Die Erfindung wird nun anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 Eine Darstellung des Prinzips der Beobachtung unter einem Winkel zur Beleuchtung.

Fig. 2 Die schematische Darstellung des Strahlengangs in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops.

Fig. 3 Die schematische Darstellung des Strahlengangs in einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops.

Fig. 1a stellt die Anordnung der Objektive und die Beobachtungsvolumina für eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops dar, bei dem zwei Objektive 2 und 4, deren Achsen

senkrecht aufeinander stehen, um den Objektpunkt 3 angeordnet sind.

Fig. 1b stellt die Anordnung der Objektive und die Beobachtungsvolumina für eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops dar, bei dem drei Objektive 2, 4 und 17, von denen zwei (2 und 4) senkrecht aufeinander stehen und das dritte Objektiv 17 auf einer gemeinsamen Achse mit einem der ersten beiden Objektive 2 liegt, um den Objektpunkt 3 angeordnet sind.

Links ist jeweils angegeben, wie die Objektive um den Objektpunkt 3 angeordnet sind. Die Pfeile deuten die Lichtwege 1 und 5 an. In Fig. 1b erfolgt demgemäß die Beleuchtung über zwei gegenüberstehende Objektive 2 und 17. Die beiden Teilbeleuchtungsstrahlen sind hierbei kohärent und die Phasendifferenz ist so eingestellt, daß sie im geometrischen Fokus konstruktiv interferieren.

Die zweite Graphik gibt jeweils das Beleuchtungsvolumen 18 bzw. 22, das längs der Beleuchtungsachse ausgedehnt ist, und die dritte Graphik das Detektionsvolumen 19 bzw. 23, das längs der Detektionsachse ausgedehnt ist, wieder. Die vierte Graphik stellt jeweils die Überlagerung des Beleuchtungs- und des Detektionsvolumens 20 bzw. 24 dar. Rechts wird schließlich jeweils das resultierende Beobachtungsvolumen 21 bzw. 25 der Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops dargestellt. Je kleiner das Volumen des Ellipsoids ist, desto besser ist die Auflösung des Mikroskops.

Wie in Fig. 2 dargestellt wird das Licht der Lichtquelle, die vorteilhafterweise ein Laser ist, kollimiert. Das Licht des Beleuchtungsstrahls 1 fällt auf das Objektiv 2, das es auf den abzubildenden Punkt im Objekt 3 fokussiert. Ein zweites Objektiv 4 ist so angeordnet, daß es vorzugsweise auf den gleichen Punkt 3 fokussiert ist, aber nicht auf einer gemeinsamen Achse mit dem Objektiv 2 liegt. Das Objektiv 4 erfaßt das von dem abzubildenden Punkt 3 ausgehende Licht. Dieses Licht 5 wird über die Linse 6 in die Lochblende 7 fokussiert. Der Lichtdetektor 8 mißt vorzugsweise die Intensität des durch die Lochblende 7 gelangten Lichts. In dem Lichtweg können auch Spiegel und/oder andere Umlenkelemente angeordnet sein.

Das Beleuchtungslicht wird durch das Objektiv 2 fokussiert. Die Intensitätsverteilung im Fokalebereich des Objektivs 2 wird durch die Beleuchtungs-Punktverschmierungsfunktion (B-PVF)  $|h_{bel}(x,y,z)|^2$  beschrieben. Die B-PVF ist die Punktverschmierungsfunktion (PVF) eines konventionellen und die B-PVF eines konfokalen Mikroskops. Die Wahrscheinlichkeit, mit der das von dem Fokalebereich ausgehende Licht durch das Objektiv 4 detektiert wird, beschreibt die Detektions-Punktverschmierungsfunktion (D-PVF)  $|h_{det}(x,y,z)|^2$ . Die PVF eines konfokalen Mikroskops und also auch des erfindungsgemäßen Mikroskops ergibt sich aus dem Produkt der B-PVF und der D-PVF. Die räumliche Begrenzung der PVF ist ein Maß für die Auflösung des Mikroskops. Durch die Drehung der D-PVF gegen die B-PVF um einen Winkel, der kleiner oder größer als  $\pi$  ist, wird die B-PVF mit einer D-PVF multipliziert, die eine wesentlich geringere Ausdehnung längs der Beleuchtungsachse hat. Die Beleuchtungsachse ist die Achse des Objektivs 2, das zur Beleuchtung verwendet wird. Dadurch wird die Ausdehnung der PVF längs dieser Achse deutlich geringer als bei den bisher bekannten konfokalen Mikroskopen. Die Ausdehnung längs der Achse des Objektivs 4 nimmt nur wenig zu, so daß insgesamt das Volumen der PVF des Mikroskops abnimmt und auch

insgesamt eine Auflösungsverbesserung eintritt.

Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops besitzt die höchste Auflösung, die ein Fernfeld-Lichtmikroskop mit zwei Objektiven ohne die Benutzung von Interferenz haben kann. Durch die Unabhängigkeit von einem Interferenzmuster ist das erfindungsgemäße Mikroskop nicht mit der Problematik der Phasendifferenz behaftet. Der Begriff der Objektebene verliert in diesem Aufbau seine herkömmliche Bedeutung.

Falls Objektrasterung durchgeführt wird, befindet sich das Objekt auf einem — hier nicht eingezeichneten — Tisch, der die vorteilhafterweise beliebige Translation und/oder Rotation des Objekts erlaubt. Falls Strahlrasterung vorgesehen ist, ist eine — hier nicht eingezeichnete — Rastereinheit in dem Beleuchtungsstrahlengang angeordnet, die den Beleuchtungspunkt durch das Objekt bewegt. Gleichzeitig muß auch der Detektionspunkt verändert werden, so daß Beleuchtungs- und Detektionspunkt im Objekt unter kontrollierten Bedingungen verändert werden.

In Fig. 3 ist die schematische Darstellung einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops dargestellt, das die Interferenz der Beleuchtungslichtstrahlen im abzubildenden Objektpunkt zur Verbesserung der Auflösung ausnutzt.

Das Licht 1 wird von dem Strahlteiler 9 in zwei zueinander kohärente Lichtstrahlen aufgespalten. Der nach oben abgespaltene Teil des Lichts wird mit Hilfe von Spiegeln 13 und 14 oder anderen Umlenkelementen auf das Objektiv 2 gelenkt. Der nach unten abgespaltene Teil des Lichts wird mit Hilfe von Spiegeln 10, 11 und 12 oder anderen Umlenkelementen auf das Objektiv 17 gelenkt. Das Objektiv 2 fokussiert das auf es treffende Licht auf den abzubildenden Punkt 3 in dem Objekt. Das zweite Objektiv 17 ist vorzugsweise so angeordnet, daß es auf derselben Achse liegt wie das erste Objektiv 2 und vorzugsweise auf den gleichen Punkt 3 fokussiert ist. Ein drittes Objektiv 4 ist so angeordnet, daß es auf den gleichen Punkt 3 wie die beiden Objektive 2 und 17 fokussiert ist, aber nicht auf einer gemeinsamen Achse mit den beiden Objektiven liegt. Dieses Objektiv 4 sammelt das von dem abzubildenden Punkt 3 ausgehende Licht. Dieses Licht 5 wird über die Linse 6 in die Lochblende 7 gelenkt. Der Lichtdetektor 8 mißt das Signal des durch die Lochblende 7 gelangten Lichts. In beiden Teilbeleuchtungsstrahlengängen sind Kompensationsvorrichtungen 15 und 16 angeordnet, die zur Veränderung der Phasendifferenz zwischen den oberen und unteren Teilstrahlen dienen und die Interferenz der Teilstrahlen im Objekt gewährleisten.

Die räumliche Kohärenz der Beleuchtung ist durch die geeignete Wahl der Lichtquelle gewährleistet. Im Fokalebereich interferieren die Teilbeleuchtungsstrahlen zu einer B-PVF  $|h_{4P}(x,y,z)|^2$ , die räumlich stärker begrenzt ist, als die B-PVF in einem herkömmlichen Mikroskop. Ist die Phasendifferenz zwischen den beiden Beleuchtungsteilstrahlen im Objektpunkt 3 gleich null oder ein ganzzahliges Vielfaches von  $2\pi$ , so ist die Interferenz konstruktiv und die B-PVF hat ein Maximum im Objektpunkt 3. Die B-PVF weist aber mehrere Nebenmaxima längs der Beleuchtungsachse auf, die die Auflösung herabsetzen. Das erste Intensitätsmaximum von  $|h_{4P}(x,y,z)|^2$  liegt etwa eine halbe Wellenlänge vom absoluten Intensitätsmaximum im Brennpunkt entfernt. Diese Nebenmaxima werden aber nun durch eine Detektion unter einem Winkel von vorteilhafterweise  $\pi/2$  effektiv unterdrückt, da die Ausdehnung der D-PVF längs

der Beleuchtungsachse sehr klein ist. Dadurch hat die PVF des erfindungsgemäßen Mikroskops eine axiale Ausdehnung, die im wesentlichen durch die des Hauptmaximums der B-PVF  $|h_{4P}(x,y,z)|^2$  bestimmt wird. Dies bedeutet, daß die Auflösung im erfindungsgemäßen Mikroskop substantiell verbessert wird.

#### Bezugszeichenliste

#### 10 Zeichnung zur Zusammenfassung und Zeichnung 2

- 1 Beleuchtungsstrahl
- 2 Beleuchtungsobjektiv
- 3 Objektpunkt
- 4 Detektionsobjektiv
- 5 Detektionsstrahl
- 6 Linse
- 7 Blende
- 8 Lichtdetektor

#### Zeichnung 1

- a) Ausführungsform mit zwei Objektiven
- b) Ausführungsform mit drei Objektiven

Jeweils von links nach rechts:

Anordnung der Objektive; Beleuchtungsvolumen; Detektionsvolumen; Überlagerung von Beleuchtungs- und Detektionsvolumen; resultierendes Volumen

#### Zeichnung 3

- 1 Beleuchtungsstrahl
- 2 Beleuchtungsobjektiv
- 3 Objektpunkt
- 4 Detektionsobjektiv
- 5 Detektionsstrahl
- 6 Linse
- 7 Blende
- 8 Lichtdetektor
- 9 Strahlteiler
- 10—14 Spiegel
- 15, 16 Interferenzveränderungsmittel
- 17 Beleuchtungsobjektiv.

#### Patentansprüche

1. Mikroskop mit mindestens einer Lichtquelle, mindestens einem Lichtdetektor und mindestens zwei Objektiven, die mindestens einen Objektpunkt beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei der Objektive nicht auf einer gemeinsamen Achse liegen.
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Objektive mindestens einen Objektpunkt gleichzeitig beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln.
3. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Objektive mindestens einen gemeinsamen Objektpunkt beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln.
4. Mikroskop nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Interferenzveränderungsmittel derart angeordnet sind, daß Licht, das ganz oder teilweise durch eines der Objektive hindurchgegangen ist, mit Licht, das ganz oder teilweise durch ein anderes der Objekti-

ve hindurchgegangen ist, am Objekt und/oder an mindestens einem der Detektoren kohärent oder teilweise kohärent überlagert wird, so daß es interferiert und eine gezielte Beeinflussung der Interferenzen möglich ist.

5. Mikroskop nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß an dem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem der Lichtdetektoren zumindest zeitweise konstruktive Interferenz auftritt.

6. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwei Objektive so angeordnet sind, daß sie auf denselben Objektpunkt fokussiert sind und ihre Achsen senkrecht aufeinander stehen.

7. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der mindestens drei Objektive eine gemeinsame Achse haben.

8. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß drei Objektive so angeordnet sind, daß ihre Achsen paarweise senkrecht aufeinander stehen.

9. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß drei, vier, fünf oder sechs Objektive so auf einer Kugelfläche um den gemeinsamen geometrischen Fokus und/oder den abzubildenden Punkt angeordnet sind, daß ihre Achsen beliebige Winkel zueinander einnehmen.

10. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß vier, fünf oder sechs Objektive senkrecht zu den Flächen eines Würfels angeordnet sind, in dessen Mitte der gemeinsame geometrische Fokus und/oder der abzubildende Objektpunkt liegt.

11. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Objektive die gleiche numerische Apertur oder auch verschiedene numerische Aperturen haben.

12. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sich in mindestens einer Ebene, die zu einer der Fokalebene der Objektive optisch konjugiert ist, mindestens eine Blende befindet.

13. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Interferenzveränderungsmittel an dem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem der Detektoren eine Überlagerung kohärenter oder teilweise kohärenter Lichtstrahlen ermöglicht, die jeweils durch verschiedene Objektive getreten sind.

14. Mikroskop nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Kompensationsvorrichtung an dem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem der Detektoren zumindest zeitweise konstruktive Interferenz der Lichtstrahlen hervorruft.

15. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Interferenzen durch die Interferenzveränderungsmittel schnell oder auch langsam durchgeführt wird.

16. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Interferenzen periodisch durchgeführt wird.

17. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Signalauswertung zumindest teilweise mit einem Computer erfolgt.

18. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Anordnung von optischen Elementen zur Veränderung der Amplitude und/oder der Polarisation und/oder des Frequenzbereichs und/oder anderer Eigenschaften des Lichts in den Beleuchtungs- und/oder den Detektionsstrahlengängen vorgesehen sind.

19. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Fluoreszenzmikroskop oder als Mikroskop zur Beobachtung von Streu- oder Reflexionslichts verwendet wird.

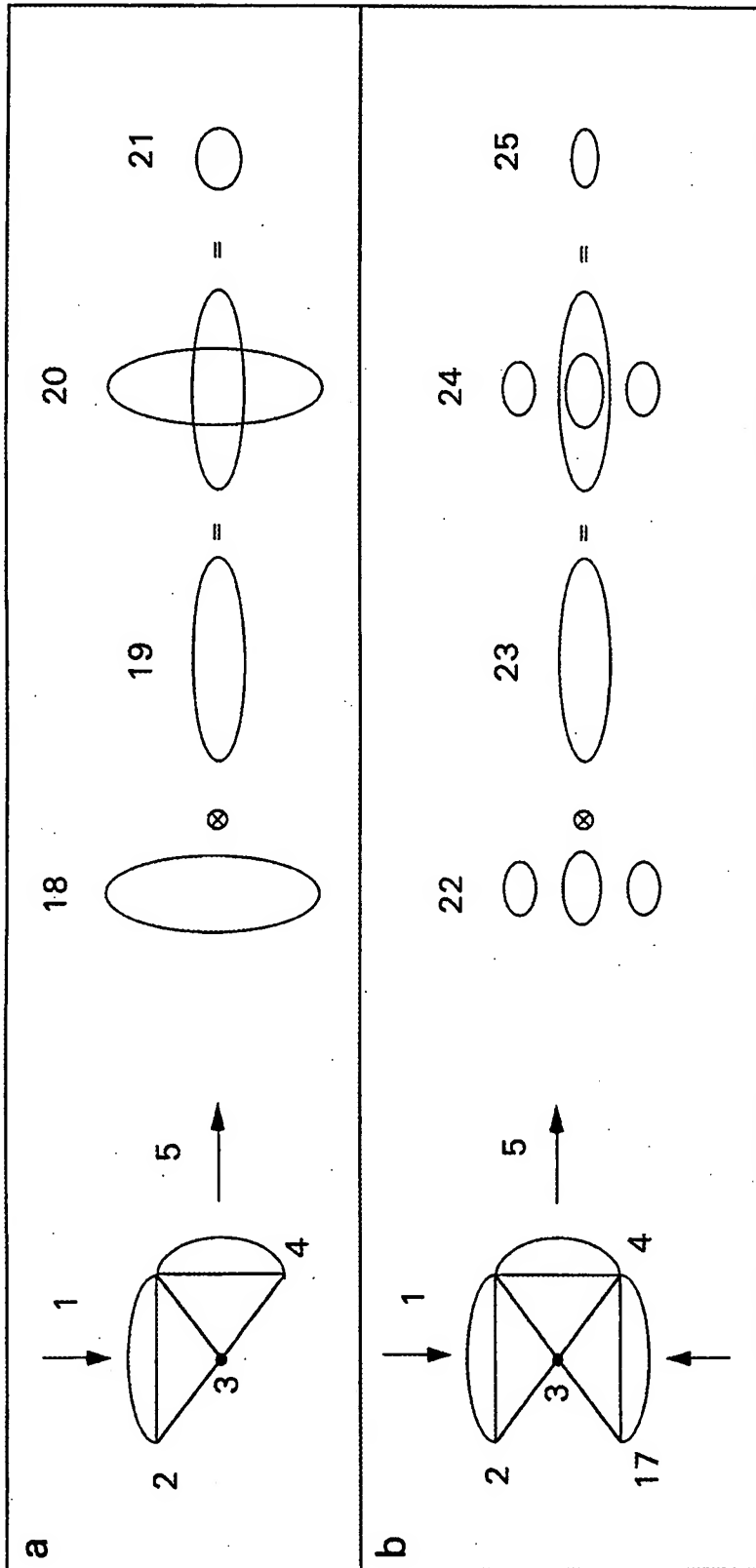
20. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lichtquelle eingesetzt wird, die Mehrphotonenabsorption ermöglicht, insbesondere ein Laser, der Zweiphotonenabsorption ermöglicht.

21. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zu einer der Fokalebene konjugierten Blenden entfernt und/oder ausgetauscht und/oder in ihrer Öffnung variiert und/oder parallel und/oder senkrecht zu dem Lichtweg verschoben werden können.

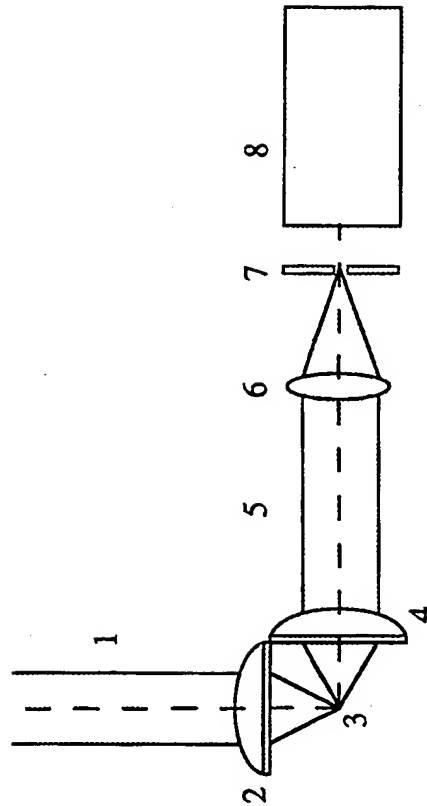
22. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Beleuchtungs- und/oder Detektionslicht durch optische Fasern gelenkt wird.

23. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich optische Elemente mit mindestens einem Lichtdetektor angeordnet sind, insbesondere um zusätzliche Bilder, beispielsweise mit doppelkonfokaler oder herkömmlich konfokaler oder konventioneller Auflösung zu erhalten.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen



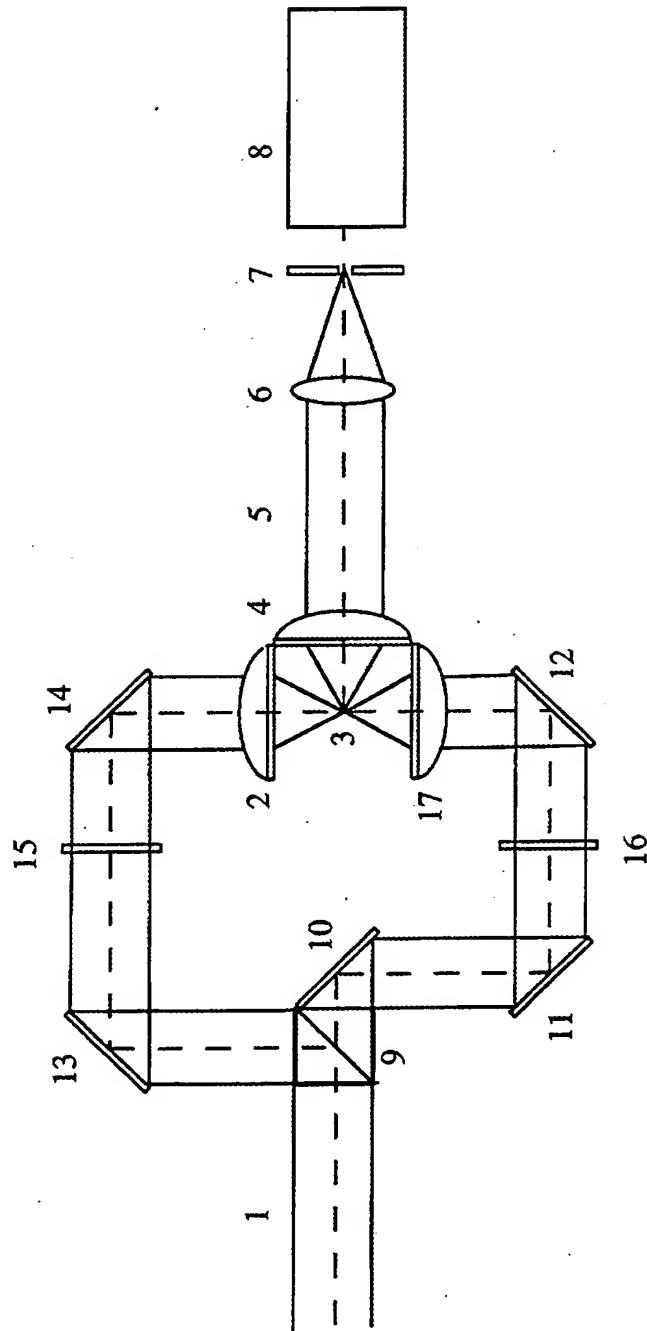
Zeichnung 1



Zeichnung 2



Zeichnung 3





Europäisches  
Patentamt  
European Patent  
Office  
Office Européen  
de Brevets

Description of DE4326473

Print

Copy

Contact Us

Close

## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

The invention concerns a raster microscope with at least one source of light, at least one light detector and at least two objectives, which light up at least one, preferably common, point of object, preferably at the same time, and/or collects the light outgoing from it, whereby at least two of the objectives do not lie on a common axle.

For the exact three-dimensional collection of point object or one point of an object with a microscope the dissolution is to be improved along all three space axes. This can take place by means of enlargement of the aperture of the objectives and/or memo reduction of the wavelengths in and/or outgoing light. So far with the development by microscopes special value was put on enlargement of the aperture of the objectives. Thus above all the dissolution is increased perpendicularly to the lighting axle, which is usually called Z-axis. From the technical-industrial literature confocal raster microscopes are well-known, which a dissolution along the Z-axis (axial dissolution) exhibit and pictures with a clearly improved sharpness to produce can. A problem is that objectives seize maximally 35% of the surface centered around the Z-axis. That leads to the fact that the axial dissolution is at best three times bad like the axial dissolution. Generally the relationship is larger.

For the additional increase of the dissolution in axial direction in the DE-OS 40 40 441 a doubleconfocal raster microscope was suggested, which is characterized by the use of a second objective on the other side of the object level, whereby both objectives light up a common point of object at the same time and/or detects the light outgoing from it. If the object is coherently lit up over the two objectives, then the observation volume is reduced by interference along the Z-axis. Two problems of this method are: a) The phase difference in the common geometrical focus of the objectives is not to be determined A priori, so that the light distribution is unknown first. Favourable way must be the phase difference an integral multiple of 2, so that the interference is constructional. b) In the favourable case of the constructional interference in the geometrical focus further axial Nebenmaxima arises apart from the narrow major peak, so that except the point in the geometrical focus, which can be illustrated, still different points contribute substantially to the signal doubleconfocally of the raster microscope. For these reasons the doubleconfocal raster microscope does not lead first to pictures with a higher resolution.

These well-known raster microscopes define one object level and differentiate thereby of the raster microscope according to invention. They are not suitable for, light which proceeds perpendicularly to the lighting direction from the point of object which can be illustrated to detect. The moreover they differentiate by the definition of an Z-axis and possess themselves (in the case of the doubleconfocal raster microscope) preferably two objectives, which are to each other centered against each other arranged and to this Z-axis and.

The doubleconfocal raster microscope serves contrary to the raster microscope according to invention for the improvement of the Auflösung alone by means of interference. The actual improvement of the dissolution depends thereby of the solution of the two problems specified above.

Those the available invention underlying task consists of suggesting a raster microscope whose dissolution is in approximately alike along all three space axes and which is smaller observation volume than in the well-known raster microscopes. The task can it be also attained the goal without the phase difference of the lighting and the detection light admits is.

This task is solved according to invention by the fact that with a raster microscope of the kind initially specified at least two objectives are in such a manner arranged that they light up at least one point of object at the same time and/or collects the light outgoing from it, whereby at least two of the objectives do not lie on a common axle.

Additionally as with a doubleconfocal raster optical microscope interference change means can be in such a manner arranged, D light, which passed through totally or partly through one of the objectives, with light, which passed through totally or partly through de other objectives, at the object and/or at at least one of the light detectors coherently or partly coherently are overlaid, so that it interferes and a purposeful influence of the interference samples by interference change means is possible.

Preferably two objectives are in such a way arranged that they are focused on the same point of object and their axes perpendicularly one on the other.

In accordance with a further preferential execution form three objectives are in such a way arranged that they are focused on the same point of object and the axes of two objectives perpendicularly one on the other, while the axle de of third objective lies on the axle one of the two other objectives.

In accordance with a further preferential execution form three objectives are in such a way arranged that its axes stand perpendicularly in pairs one on the other.

In accordance with further preferential execution forms are so on a Kugeloberfläche around the common geometrical focus and/or the point which can be illustrated located four, five or six objectives that its axes take arbitrary angles to

each other.

In accordance with further particularly preferential execution forms are four, five or six objectives perpendicularly to the surfaces of a cube arranged, in whose center the common geometrical focus and/or the point of object which can be illustrated lie.

The objectives the the same numeric aperture or also different have favourable way.

In accordance with a particularly preferred execution form at least one screen is in at least one of the levels, which are optically conjugated to the Fokalebenen of the objectives. A screen is registered in particular then planned, if the level before a light detector, conjugated optically to the Fokalebene, is, that the light gone through the screen, and/or if this screen in the lighting jet serves the source of light for the figuration. This screen is usually a Lochblende.

In accordance with a particularly preferred execution form interference is used while the loading of the lighting rays of light and/or while the loading of the detection rays of light for the improvement of the dissolution. Light, which passed through totally or partly through one of the objectives, with light, which passed through totally or partly through one of the other objectives, at the object and/or at at least one of the light detectors is overlaid coherently or partly coherently, so that it interferes and a purposeful influence of the interference samples by interference change means is possible. Here the objectives, through which the interfering rays of light go, can be appropriate for the same on axle or on axles, which form an angle, which smaller as if is, lie. The term of the object level loses usual meaning in this structure SE.

The interference change means the interference samples change favourable way fast or also slowly. In particular a compensation device changes the phase difference between the rays of light, which pass through durc one of the objectives, and which rays of light, which pass through by another of the objectives, fast or also slowly.

In accordance with a further particularly preferential execution form the change of the interference samples becomes periodic durchgeföhr

The raster microscope according to invention can be a fluorescence microscope. By suitable optically active elements can the interference of jets, which fall by different objectives, caused or are prevented. In addition, the raster microscope according to invention can be a microscope, which works with scattered light. During the observation of scattered light suitable polarisation filters can be introduced into paths of rays. Suitable ones optical elements are for example polarizers, spectral filters and optically active elements, which change the polarization direction of the light.

As sources of light all sources are suitable, which make a sufficient intensity available. Favourable way concerns it Punktlichtquellen and/or. Sources, which can be focused on one point. Favourable way is used with Fluoreszenzmikroskopie a pulsed or also non-pulsed laser, which makes the two und/o for multi-photon absorption possible.

The detour of the rays of light in the microscope takes place over suitable returning elements. These are for example mirrors, dichroitische mirrors, beam splitters or optical fibers. Favourable way is void in the Fluoreszenzmikroskopie with detection perpendicularly to the lighting direction the use of dichroitischen mirrors in the detection light path.

As light detectors photomultipliers are well suitable, in addition, detectors with spatial dissolution and also different receivers, the light signals into electrical signals and/or. convert into electrically evaluable signals.

The invention is more near described now on the basis the attached designs. Show:

Fig. 1 a representation of the principle of the observation under an angle for lighting.

Fig. 2 the schematic representation of the path of rays in a particularly preferred execution form of the raster microscope according to invention.

Fig. 3 the schematic representation of the path of rays in a further particularly preferential execution form of the raster microscope according to invention.

Fig. 1a represents the arrangement of the objectives and the observation volumes for a preferential execution form of the raster microscope according to invention, with which two objectives 2 and 4, of them are arranged axles perpendicularly one on the other, around the point of object 3.

Fig. 1b represents arrangement objectives and observation volumes for preferential execution form according to invention raster microscope, with which three objectives 2, 4 and 17, from which perpendicularly one on the other and the third objective 17 is appropriate for two (2 and 4) on a common axle with one of the first two objectives 2, around the point of object 3 are arranged.

Left is indicated in each case, as the objectives are arranged around the point of object 3. The arrows suggest the optical paths 1 and 5. In Fig. 1b is made accordingly the lighting by two facing objectives 2 and 17. The two partial lighting jets are here coherent and the phase difference are so adjusted that they interfere in the geometrical focus constructionally.

Second graphics gives in each case the lighting volume to 18 and/or. 22, which is expanded along the lighting axle, and which third graphics the detection volume 19 and/or. 23, which is expanded along the detection axle, again. Fourth graphics places in each case the overlay of the lighting and of the detection volume 20 and/or. 24. Right finally in each case the resulting observation volume becomes 21 and/or. 25 of the execution form of the microscope according to invention represented. The smaller the volume of the ellipsoid is, so much the better is the dissolution of the microscope.

As in Fig. represented to 2 the light of the source of light, which favourable-proves a laser is, is koilimiert. The light of the lighting jet 1 falls on the objective 2, which focuses it on the point in the object 3, which can be illustrated. A second objective 4 is in such a way arranged the fact that it is focused preferably on the same point 3 but not on a common axle with the objective 2 lies. The objective 4 seizes the light outgoing from the point 3 which can be illustrated. This light 5 is focused over the lens 6 into the Lochblende 7. The light detector 8 preferably measures the intensity of the light arrived by the Lochblende 7. In the optical path also mirrors and/or other returning elements can be arranged.

The lighting light is focused by the objective 2. The distribution of intensity in the Fokalbereich of the objective 2 is

described by the lighting point smudge function (B-PVF)  $\langle x, y, z \rangle$ . The B-PVF is the point smudge function (PVF) of a conventional and the B-PVF of a confocal microscope. The probability, with which the light outgoing from the Fokalbereich is detected by the objective 4, describes smudge function of point of detection (D-PVF)  $\langle x, y, z \rangle$ . The PVF of a confocal microscope and thus also the microscope according to invention results from the product of the B-PVF and the D-PVF. The spatial delimitation of the PVF is a measure for the dissolution of the microscope. By the turn of the D-PVF against the B-PVF around an angle, which smaller or more largely as if is, the B-PVF is multiplied by a D-PVF, which has a substantially smaller expansion along the lighting axle. The lighting axle is the axle of the objective 2, which is used for the lighting. Thus the expansion of the PVF becomes along this axle clearly smaller than with that so far admitted to confocal microscopes. The expansion lengthen the axle of the objective 4 increases only few, so that altogether the volume of the PVF of the microscope decreases and also altogether occurs a dissolution improvement.

This execution form of the microscope according to invention possesses the highest resolution, which can have a far field optical microscope with two objectives without the use of interference. By the independence from an interference sample the microscope according to invention is not afflicted with the problem of the phase difference. The term of the object level loses its conventional meaning in this structure.

If object grid is accomplished, the object on one - here not drawn in - is table, which favourable-proves arbitrary translation and/or rotation of the object permits. If jet grid is intended, one - here not drawn in - is arranged raster unit in that illumination beam path, which moves the lighting point by the object. At the same time also point of detection must be changed, so that lighting and point of detection in the object under controlled conditions are changed.

In Fig. the schematic representation of a further preferential execution form of the raster microscope according to invention is represented 3, which uses the interference of the lighting rays of light in the point of object improvement of the dissolution which can be illustrated.

The light 1 is split up by the beam splitter 9 into two to each other coherent rays of light. The upward abgespaltene part of the light is steered by mirrors 13 and 14 or other returning elements on the objective 2. The downward abgespaltene part of the light is steered by mirrors 10, 11 and 12 or other returning elements on the objective 17. The objective 2 focuses light the meeting it on the point 3 in the object, which can be illustrated. The second objective 17 is preferably in such a way arranged the fact that it lies on the same axle as the first objective 2 and preferably on the same point 3 is focused. A third objective 4 is in such a way arranged the fact that it is focused on the same point 3 as the two objectives 2 and 17 but not on a common axle with the two objectives lies. This objective 4 collects the light outgoing from the point 3 which can be illustrated. This light 5 is steered over the lens 6 into the Lochblende 7. The light detector 8 measures the signal of the light arrived by the Lochblende 7. In both partial lighting paths of rays compensation devices 15 and 16 are arranged, which serve the phase difference between the upper and lower partial jets for the change and which ensure interference of the partial jets in the object.

The spatial coherency of the lighting is ensured by the suitable choice of the source of light. In the Fokalbereich the interferie partial lighting jets to a B-PVF  $\langle x, y, z \rangle$ , which is spatially more strongly limited, as the B-PVF in a conventional microscope. If the phase difference between the two lighting partial jets is equal in the point of object 3 zero or an integral multiple of  $2\pi$ , then the interference is constructional and the B-PVF has a maximum in the point of object 3. The B-PVF exhibits however several Nebenmaxima along the lighting axle, which lower the dissolution. The first intensity maximum of  $\langle x, y, z \rangle$  lies about a half wavelength far away from the absolute intensity maximum in the focus. This Nebenmaxima however now suppressed by a detection under an angle of favourable-proves  $\pi/2$  effectively, since the expansion of the D-PVF is very small along the lighting axle. Thus the PVF of the microscope according to invention has an axial expansion, which is essentially determined by those of the major peak of B-PVF  $\langle x, y, z \rangle$ . This means that the dissolution in the microscope according to invention is substantially improved. Reference symbol list

Design for the summary and design 2 1 lighting jet 2 lighting objective 3 point of object 4 detection objective 5 detection jet 6 lens 7 screen 8 light detector

Design 1 A) execution form with two objectives b) execution form with three objectives from left to right in each case: Arrangement of the objectives; Lighting volume; Detection volume; Overlay of lighting and detection volumes; resulting volume

Design 3 1 lighting jet 2 lighting objective 3 point of object 4 detection objective 5 detection jet 6 lens 7 screen 8 light detector of 9 beam splitters of 10-14 mirrors of 15, 16 interference change means 17 lighting objective.